

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-96557

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月27日

G 01 N 33/543
33/577A-7906-2G
A-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑮ 発明の名称 免疫学的測定法

⑯ 特 願 昭62-249098

⑰ 出 願 昭62(1987)10月1日

優先権主張 ⑱ 1986年10月2日 ⑲ ドイツ(DE) ⑳ P3633497.7

㉑ 発 明 者 ゲルト・シュノル ドイツ連邦共和国デー - 6368バートヴィルベル。アウフデムラティヒコプフ23

㉒ 発 明 者 ヘルムート・シュトレツカー ドイツ連邦共和国デー - 6102プフングシュクト・オーデンヴァルトシュトラッセ56

㉓ 発 明 者 ベーター・モルツ ドイツ連邦共和国デー - 6500マインツ・カイザー・ヴィルヘルム - リング44

㉔ 出 願 人 ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国フランクフルト・アム・マイン(番地なし)

㉕ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称 免疫学的測定法

2 特許請求の範囲

1) 抗原物質(a)を含有する液体試料を、固相に固定され、未標識であり、(a)に対して特異的である抗体(b)およびもう一つの、(a)に対して特異的である標識された抗体(c)と連続してまたは一段階でインキュベーションして、(a)の量に相当する検出可能なシグナルを発する、固相に結合した、(a)、(b)および(c)からなる三成分複合物を形成させることにより少くとも2個の抗体結合部位を有する抗原物質を免疫学的に測定するに当たり、第1回目の測定においてはコア測定領域および拡大測定領域を包含する全測定領域にわたり抗原濃度を測定し、そして次に拡大測定領域中において抗原の濃度が測定された試料を、抗原および/ま

たは抗原等価物の量を高めたのちに第2回目の測定にかけることを特徴とする方法。

2) 第2回目の測定において抗原量が高めるために比較的大量の試料を使用しそして第1回目の測定より短時間インキュベーションしたのち抗原量を測定することを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の方法。

3) 第2回目の測定に先立ち、さらに抗原および/または抗イデオタイプ抗体を添加することにより抗原濃度を高めることを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の方法。

4) 固相に固定された未標識抗体(b)がモノクローナル抗体であるかまたはポリクローナル抗体であることを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の方法。

5) 未標識抗体(b)が固相に吸着によるかまたは共有により結合していることを特徴とする、

特許請求の範囲第4項記載の方法。

6) 固相がプラスチックチューブ、マイクロ滴定プレート、プラスチックビーズまたはプラスチックプロベラから成るかまたは液体中に懸濁された顕微鏡的小ささのプラスチックビーズからなることを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の方法。

7) 標識された抗体(c)がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり、そしてインディケーターとして放射性同位元素、酵素、蛍光素または化学ルミネセンス素を担持することを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の方法。

8) 測定される抗原物質がヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)であるかまたは腫瘍胎児性タンパク質である α -フェトプロテイン、ヒト絨毛ゴナドトロピンまたは癌胚抗原であることを

特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は少なくとも2個の抗体結合部位を有する抗原物質の免疫学的測定法に関する。

大規模に抗原を定性的かつ定量的に測定するには免疫学的測定法がますます用いられてきていることは知られている。これらの方法は結合相手の一方が標識されている、抗原と1種またはそれ以上の抗体との複合物の形成に基づく。それにより、抗原と1種またはそれ以上の抗体からなる複合物が生成したか否かおよびいかなる量で生成したか測定できる。この免疫学的測定法はモノクローナル抗体(MilsteinおよびKöhler、1975年)の導入により決定的な改良がなされ、免疫測定法におけるその使用は西ドイツ特許公開報第3,130,834号に詳細に記載されている。

免疫学的測定法は抗原または抗体のいずれが標識されているかの如何により2つの大きな種類に分けられうる。標識された結合体が常に過剰に使用される。

使用される抗体の一方が標識された免疫学的測定法が特に興味を持たれた。かかる方法では抗原は三成分複合体の形でサンドイッチ状に結合され、そしてインキュベーション後に結合しなかつた標識された抗体が反応混合物と一緒にデカンテーションまたは洗去により除去される。これらの実施形は標識の種類に応じ、二例性免疫放射線測定法(IRMA)、免疫酵素測定法(IEMA)または免疫化学ルミネセンス測定法(ICMA)として知られる。これらの方法では大抵の場合は未標識抗体が固相に結合される。

前記したサンドイッチ法は、三成分複合物を形成させる反応段階が相異する種々の方法で実

施されうる。抗原を一容器反応で標識された抗体および未標識抗体と同時に混合することができるが、しかし連続して操作して、抗原をはじめ未標識抗体と反応させ、そして充分なインキュベーション時間をおいたのちに標識された抗体と反応せしめることもできる。終りに、これらの反応段階は逆の順序でも実施できる。

標識された抗体の使用に基づくサンドイッチ法は標識された抗原の使用の下に実施される検定に比較して決定的に分析上有利である。すなわち抗体を過剰に使用しそしてその濃度を高めることにより均衡を三成分複合物の形成の方向にシフトさせることができる。従つてわずかな量の抗原でも結合させ標識にカップリングさせることができる。加えて標識から発せられるシグナルが抗原濃度に正比例しているので低濃度の抗原により惹起される弱いシグナルも明確に

識別されうる。この理由で、標識された抗体を用いて操作されるサンドイッチ法が、標識された抗原の使用に基づく検定より相当に感度が良い。

終りに、標識された抗体を用いて操作するサンドイッチ法のもう一つの利点は、その力学的測定範囲がかなり大きいことである。すなわち抗原の濃度が変化しても三成分複合物から発せられるシグナルの強度が検出可能に変動する比較的大きい領域が存在する。その他、商業的な免疫学的測定法のルーチン使用にとつてはそれらが最も短いインキュベーション時間で行われうることもまた重要である。このことは、サンドイッチ法における標識された抗体の使用がそうであるように、比較的高濃度の試薬が使用されうる場合に保証される。

しかしながらこれらの方法の利点に対しては

に対し拡大測定領域で得られる結果には2種の全く異なる抗原濃度が割当てられうる。この現象は「高濃度フック効果 (high-dose hook effect)」として知られておりそしてこのことは試料中の抗原含量が、非常に低い濃度で終る標準曲線に割当てられた場合には実際よりかなり低い値が出るという結果をもたらす。

これに対し(4)領域で測定された最高標準物より高いシグナルは明白であり、そして適当な希釈後に正確に特定化されうる。

「高濃度フック」効果は、その測定法が一容器法で行われる場合は実際上常に観察されるが、しかし連続的インキュベーションの場合にも出現する。

原因としては、一方では抗原濃度が高い場合に立体効果の結果として、標識された抗体の後程の離脱を惹起する、親和性定数の変化が論議

決定的な欠陥が存在する。すなわち、測定されたシグナルが全濃度範囲において明白に特定の抗原量に相関しないことである。むしろ、特に抗原濃度が高い場合は、比較的抗原濃度が低い場合におけるよりも弱いシグナルが得られる。このことは、発せられる測定シグナルの強度が抗原濃度の函数として示されている第1図に表わされている。この量/作用曲線は3種の領域に分けられる。

- a) コア測定領域および拡大測定領域からなる標準曲線領域(A)。
- b) 測定シグナルが最高標準物の測定シグナルよりも大きい領域(B)。
- c) 抗原濃度が数倍高くても、測定シグナルが標準曲線に対応する領域(C)。

第1図はコア測定領域においてのみ1回の測定で明白な結果が得られうることを示す。これ

され、もう一方では一容器法においては高濃度の抗原に比較して標識された試薬が過剰な状態はもはや通用しないことが論議される。このことは、抗原が固相に結合した未標識抗体のすべての結合点のみならず、標識された抗体の結合部位をも占めることとなり、それにより三成分複合物の形成が不可能となる。この競合性は抗原濃度が比較的低い場合は存在しないので、三成分複合物が生成しそして抗原濃度に対応する測定シグナルが発せられうる。

連続的インキュベーションを用いる測定法においても、抗原を含有する液体試料が、固定された未標識の抗体との反応後に標識された抗体の添加に先立ち定量的に除去されない場合には同じく「高濃度フック」効果が現われうる。次に、高濃度の未結合抗原が試験管中に残留して、次に添加された標識された抗体を遮断するとい

う危険が存在する。固相を洗い去ることにより、標識された抗体の添加に先立ち液体試料の残分を定量的に除去することは困難である、何故なら各洗浄段階で、抗原と未標識抗体とから形成される複合物の当然でできるだけ阻止されるべき解離も生じるからである。それゆえ所望されるだけの数の洗浄段階をとり行うことはできない。

「高濃度フック効果」による過つた測定結果の検出は従来法ではこれまで以下の方法で行われた。

a) 分析すべき液体試料を2つの異なる希釈度で測定した。その場合希釈にも拘らず測定シグナルが強まつたならば、第1図の観察から直ちに明らかであるように「高濃度フック効果」の存在が結論できた。

b) 連続インキュベーションを用いる測定法を選択しそしてその順多数の洗浄段階により、標

識された抗体の添加に先立ち何ら遊離の抗原が最早や存在しないように確保する。

これら両測定法共多大なる費用がかかる。

今、本発明による測定法により、「高濃度フック効果」の識別法が示された。それによれば第1図目の測定において、抗原をすべての生薬学的に可能な濃度で含有しうる液体試料中の抗原濃度をサンドイッチ法により測定し、そして次に特定の選択された試料のみを後続の迅速試験にかける。かくしてすべての試料にとつて明白な結果がわずかな工業的費用を用いて得られる。

それゆえ本発明は抗原物質(a)を含有する液体試料を、固相に固定され、未標識であり、(a)に対して特異的である抗体(b)およびもう一つの、(a)に対して特異的である標識された抗体(c)と連続してまたは一段階でインキュベーションして、

(a)の量に相当する検出可能なシグナルを発生する、固相に結合した(a)、(b)および(c)からなる三成分複合物を形成させることにより少くとも2個の抗体結合部位を有する抗原物質を免疫学的に測定するにあたり、第1図目の測定においてはコア測定領域および拡大測定領域を包含する全測定領域にわたり抗原濃度を測定しそして次に拡大測定領域中において抗原の濃度が測定された試料を、抗原および/または抗原等価物の量を高めたのちに第2図目の測定にかける方法に関する。

第2図目の測定でシグナルの相異を生成させるためには下記の方法が可能である。

a) 第2図目の測定を実施するに先立ち試料中に付加的な抗原または抗原等価物を添加しうる。抗原等価物としては抗イディオタイプ抗体が使用されうる。

b) 測定を比較的大量の試料を用いて実施できる。

その場合に現われる効果を第2図に示す。第2図には抗原濃度の函数としての測定シグナルが種々の試料量について示されている。試料量が減少すると曲線が右側にシフトすることが明らかである。測定を中間試料量 V_2 を用いて実施するならば抗原濃度 C_1 および C_2 に対する測定シグナル M_2 が得られる、すなわち2種の試料の抗原濃度が大巾に相違しているとしてもそれらを区別できない。今、抗原濃度を高めた場合、 C_1 のシグナル M_2 はより高い値(M_2')に劇的に移行し、一方 C_2 に属するシグナル M_2'' はわずかに弱まるのみである。第1図目の測定で得られるシグナルを第2図目の測定シグナルと比較することにより、試料には明白な濃度範囲が割当てられうる、すなわち「高濃度フック効果」が確認

されるかまたは排除されうる。

抗原が容易には入手できない場合は、その代りにその抗原等価物、抗イデオタイプ抗体が用いられることもできる。抗イデオタイプ抗体は抗原と相違して1個しか抗体に対する結合部位を有しないので、三成分複合物の形成を阻止しうる。それゆえ、この場合抗原濃度が低いと測定シグナルの弱化を招くが、一方抗原濃度が高いとほとんど変化しない（これに関しては実施例3も参照されたい）。

しかしまた「高濃度フック効果」は、第2回の測定に対し試料量を増大させることにより、検出すべき抗原量を高めることによつても認識されうる。第2回目の測定を第2図に示される試料量 V_2 で実施するならば、濃度 C_1 においてはシグナル M_{S1} が、そして濃度 C_2 においてはシグナル M_{S2} が得られる。これらシグナルの強度は第

することにより用いられる。この標準曲線は抗原濃度の函数として、3つの測定領域に分けられる。すなわちコア測定領域、拡大測定領域および外側領域である。

コア測定領域は生化学的試料において重量応答曲線割当てが明瞭である領域として定義される。拡大測定領域は分析上の基準に従い測定されそしてなお高い精度で測定されうる濃度までに及ぶ。

得られる値がコア測定領域中に存在する場合は、それらは明瞭かつ最終的な結果として評価されうる。これに対し測定結果が拡大測定領域にある場合は、試験は「高濃度フック効果」の存在に対して実施されねばならない。この試験が陰性である場合は、第1回目の測定で得られる結果が明白なものと思なされる。これに対し「高濃度フック効果」が存在するならば、そ

1回目の測定で得られるシグナルとは明らかに異なる。従つて「高濃度フック効果」が存在するか否か明白に宣言しうる定量的迅速試験が可能である。

前記した2種の測定法には、第2の測定前に抗原濃度を高めるかまたは抗イデオタイプ抗体を添加すると測定シグナルがシフトすることが共通している。抗原濃度を高めた場合に測定シグナルが強まるか、または抗イデオタイプ抗体を添加した場合に弱まるならば、何ら「高濃度フック効果」は存在しえない。これに対し抗原濃度の増大または抗イデオタイプ抗体の添加にも拘らず測定シグナルがあまり実質的な変化がない場合は、「高濃度フック効果」が結論されねばならない。

実施に際しては本発明による測定法は第1回目の測定で得られた測定結果を標準曲線と比較

の試料はさらに測定した場合に明瞭な結果が得られうるまで希釈されねばならない。

第1回目の測定において拡大測定領域外に高い測定シグナルが見られる場合は、「高濃度フック効果」が存在し得ない。しかしながらその試料は第2の測定において信頼しうる値が得られうるまで希釈されねばならない。

本発明による測定法は、固相に固定された未標識抗体がモノクローナル抗体であるかまたはポリクローナル抗体である場合に特に好都合に実施されうる。このものは固相に吸着によるかまたは共有により結合されうる。固相としては肉眼で見ることのできる支持体、例えばプラスチックチップ、マイクロ滴定プレート、または種々の種類の形状をしたプラスチック成型体例えばビーズまたはプロペラが使用されうるが、固相はまた、その粒径が一般に $0.1 \mu m \sim 10 \mu m$

にある顕微鏡的粒子の懸濁液であることもできる。これらの顕微鏡的粒子はポリスチレン、ポリプロピレン、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、ガラス、二酸化珪素またはセファロースから成ることができる。

第2の、標識された抗体もモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であるべきである。このものは放射性同位元素例えばI-125またはCo-57で標識でき、その場合、三成分複合体の形成後に放射性照射を測定することにより同一の条件下に準備された標準曲線と比較して抗原の含量が測定できる。しかしながら標識化はまたペルオキシダーゼのような酵素を用いて行うこともでき、この方法では三成分複合体の形成後に酵素活性を測定することにより抗原含量が測定されう。終りに、フルオレセインのような螢光基、またはアクリジニウム誘導体のよう

な化学ルミネセンス基も指示薬として抗体に結合されう。

本発明による免疫学的測定法を用いて、生理学的濃度の抗原物質が少くとも 10^5 の範囲にわたり確実に測定されう。この方法は非常に広い種類の抗原物質の測定、例えばヒト甲状腺刺激ホルモン(hTSH)あるいは腫瘍胎児性タンパク質例えば α -フエトプロテイン、ヒト絨毛ゴナドトロピンまたは癌胚抗原(CEA)の測定に用いられう。

この新規な本発明による免疫学的測定法は信頼しう、技術的に特に簡単で、迅速で確固とした方法である。この方法は非常に多数の商業的なサンドイッチキットに使用されう。何故なら構成成分を変化させる必要がないからである。

以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

モノクローナル抗体に基づく2側性IRMAおよび2段階実施法による、患者血清中の α -フエトプロテインの放射線免疫検定

腫瘍胎児 α -フエトプロテイン(AFP)は2つの適応分野において重要である、すなわち

- (1) 胎児における神経管欠損に関するスクリーニングのためのパラメーターとして(妊娠第15~22週内の妊婦血清中における測定、確認するため、AFPをさらに羊水中で測定)。
- (2) とりわけトロホプラスト腫瘍の進行監視における腫瘍マーカーとして。

正常な範囲および病的範囲はこの2種の適応にとつてパラメーターが非常に異なる。(1)項で示される適応分野においては、血清試料はAFP 5~8000 IU/mlの範囲に適用でき、羊水試料ではAFP 1000~250000 IU/mlの範囲である。後

者試料ではAFP 10~2500 IU/mlなる値を期待するには $1/100$ の予備希釈が強制的に行われう。診断上の切り捨てポイントにはAFP約100 IU/mlである。

腫瘍学においては、腫瘍マーカーが陰性である試料ではAFP 10 IU/mlより低い値が見出され、一方高度に病的な試料ではAFP 1000000 IU/mlより高い値が示されう。従つて「高濃度フック効果」の結果としての不明瞭性なる前記した問題は後者の適応にとつてのみしか重要でない。しかしながら、臨床的なルーチン診断においては効率性ゆえに、2種の適応は1つの検定法によりカバーされるべきである。その場合どの適応分野に患者の試料があてはまるか現在にして未知でさえある。

第3図はAFPルーチン測定の代表的な頻度分布を示す。ほとんど大部分の測定値がAFP 1000

IU/ml までの範囲に見出され、いくつか少数のみが AFP 100,000 IU/ml より大きいことが明らかである。さらに、この分布においては相当して最適化された AFP 分析系に関する質量-作用(濃度/シグナル)-関連性が示される。

この関連ゆえに、標準測定領域がコア測定領域 (AFP 0~150 IU/ml) と拡大測定領域 (AFP 150~600 IU/ml) に分けられる。すべての未希釈腫瘍試料の 90% 以上がコア測定領域に存在する。拡大測定領域には 1/100 に希釈された腫瘍試料(これら試料の約 98% が AFP 600 IU/ml より下にある)、および妊婦試料(血清または 1/100 希釈された羊水試料、ここでは 99% 以上が AFP 600 IU/ml より下にある)があてはまる。

前記した予想値ゆえに、異なる種類の試料(希釈/未希釈腫瘍、妊婦血清/希釈羊水試料)にとつて制限されずに利用できる測定範囲は前記

方法で限定されうる。

第 1 回目の測定に関する操作法

[商業的なテストキット RIA 阻断 AFP c.t.

(Behring werke、マールブルグ)の構成成分が使用されうる]

充分な数の被覆された試験管中に標準液(または患者試料) 20 μ l をピペットで加える。その場合各試料には新たなピペット先を使用しなければならない。各試験管につき I-125 抗 AFP 200 μ l ずつが分配される。この 2 種の工程は分配器/希釈器システムの使用により自動化されうる。

次に試験管を 17~27°C で 2 時間振盪する。各試験管に洗浄用緩衝液 1 ml ずつを加え、上澄み液をデカンテーション(吸引)しそして 1 ml を用いて試験管を洗浄する。次に試験管をガンマカウンタ-中 1 分間測定し、そして適当な評

価法(例えばスプライン内挿法)で評価する。

コア測定領域: AFP 0~150 IU/ml

拡大測定領域: AFP 150~600 IU/ml

参考試料: AFP 100 IU/ml

第 1 表:

標準曲線

総活性: 125,774

| | | |
|-----|------------------|------------|
| 標準物 | 80 (AFP 0 IU/ml) | 135 cpm |
| | 81 (AFP 5 IU/ml) | 793 cpm |
| | 82 (" 15 ") | 2,089 cpm |
| | 83 (" 50 ") | 4,715 cpm |
| | 84 (" 100 ") | 12,711 cpm |
| | 85 (" 200 ") | 24,804 cpm |
| | 86 (" 600 ") | 69,997 cpm |

患者試料:

| | |
|-----|-----------------------------|
| 648 | 12,642 cpm = AFP 99.4 IU/ml |
| 649 | 7,750 cpm = 58.6 " |

| | |
|-----|--------------------------|
| 650 | 114,006 cpm = >600 IU/ml |
| 651 | 101,846 cpm = >600 " |
| 652 | 12,698 cpm = 157.8 " |
| 653 | 51,900 cpm = 439.8 " |
| 654 | 118,115 cpm = >600 " |
| 655 | 3,320 cpm = 24.3 " |
| 656 | 12,535 cpm = 98.5 " |
| 657 | 118,787 cpm = >600 " |
| 658 | 113,542 cpm = >600 " |
| 659 | 3,328 cpm = 24.3 " |
| 660 | 27,427 cpm = 223 " |
| 661 | 282 cpm = 11. " |
| 662 | 34,432 cpm = 302 " |

コア測定領域: 試料番号 648、649、655、

656、659、および 661。これらの結果は何れそれ以上の検査を必要としない。

拡大測定領域: 試料番号 652、653、660および

び662。これらの試料は「高濃度フック(HDH)」試験に用いられねばならない。

測定領域外：試料番号650、651、654、657および658。これらの試料は測定範囲内まで希釈されねばならない。

1 a) 「高濃度フック(HDH)」試験の操作(第2測定)

第1回目の測定と同様にするが、しかし標準系列物の代りに参考試料(例えば第1回目の測定の試験血清)のみを使用しそして試料量20 μ lの代りに50 μ lを試験管に加えることが相異なる。インキュベーション時間を10分間に減少させる。参考試料AFP 100 IU/ μ lと比較することにより評価する。もし患者の試料のシグナル(cpm)が参考試料より下にあるならば、第1回目の測定により得られる結果はHDH効果により歪曲されており、またcpm値が第1回目の測定

より上にあるならば、第1回目の測定で得られる結果が確認される。

参考試料 R (AFP 100 IU/ μ l) 31556 cpm

患者試料：

| | | |
|-----|-----------|---------|
| 652 | 1634 cpm | +++ HDH |
| 653 | 3497 cpm | +++ HDH |
| 660 | 34848 cpm | --- |
| 662 | 39997 cpm | --- |

試料652および653にはHDH効果が存在する。測定領域内まで希釈することにより含量は以下のように測定された、すなわち試料652：AFP 600,000 IU/ μ l；試料653：AFP 200,000 IU/ μ l。

試料番号660および662はHDH陰性であり、従つて第1回目の測定で本来得られた結果が確認される。試料660：AFP 223 IU/ μ l。そして試料662：AFP 302 IU/ μ l。

1 b) 抗原の添加による高濃度の試料の検出

実施例1におけると同様にして第1回目の測定を行つた。

第2表：

標準系列物

| | |
|------------------------|------------|
| 80 (AFP 0 IU/ μ l) | 215 cpm |
| 81 (4.5 ") | 841 cpm |
| 82 (22 ") | 3,223 cpm |
| 83 (88 ") | 11,767 cpm |
| 84 (440 ") | 54,236 cpm |
| 85 (840 ") | 90,153 cpm |

患者試料：

| | | |
|----|------------|----------------------|
| 79 | 1,735 cpm | AFP 10.4 IU/ μ l |
| 80 | 15,280 cpm | 115 " |
| 81 | 4,458 cpm | 32 " |
| 82 | 19,125 cpm | 145 " |
| 83 | 28,665 cpm | 221 " |
| 84 | 21,633 cpm | 165 " |

| | | |
|----|------------|-----------------|
| 85 | 83,844 cpm | 755 IU/ μ l |
| 86 | 87,969 cpm | 809 " |
| 87 | 91,833 cpm | >840 " |
| 88 | 92,335 cpm | >840 " |
| 89 | 92,797 cpm | >840 " |
| 90 | 93,035 cpm | >840 " |
| 91 | 91,933 cpm | >840 " |
| 92 | 84,541 cpm | 764 " |
| 93 | 75,772 cpm | 657 " |
| 94 | 71,703 cpm | 613 " |
| 95 | 50,732 cpm | 408 " |
| 96 | 43,110 cpm | 341 " |
| 97 | 33,238 cpm | 258 " |
| 98 | 27,673 cpm | 213 " |
| 99 | 21,081 cpm | 161 " |

試料79、80、81および82については明確な結果が得られ(コア測定領域)、そして

試料87~91は測定領域外である。

試料83、84、85、86および92~99は拡大測定領域内にあり、これらは続く「高濃度フック(HDH)」試験にかけられるべきである。

HDH試験のための操作法

第1回目の測定におけると同様に操作するが、インキュベーション混合物はAFP 2000 IU/mlを含有する試料10 μlを加えることが相異なる。

第3表:

患者試料:

| | | | | | |
|----|-------|-----|-----|-----|---------|
| 83 | 91924 | cpm | --- | HDH | |
| 84 | 91561 | cpm | --- | HDH | |
| 85 | 92121 | cpm | --- | HDH | |
| 86 | 90904 | cpm | --- | HDH | |
| 92 | 84541 | cpm | +++ | HDH | 50,000* |
| 93 | 74772 | cpm | +++ | HDH | 75,000 |
| 94 | 71289 | cpm | +++ | HDH | 100,000 |

250,000 m IU/mlの範囲にわたるが、一方腫瘍における腫瘍マーカー陰性試料は10より小さい値であり、そして陽性試料はhCG 1000,000 m IU/mlに達しうる。

このことは妊婦からの試料を予め1/200まで希釈しそして腫瘍試料を未希釈で使用する必要があることを意味する。

従つて、ルーチン診断において大部分の試料が見出されるコア測定領域がhCG 0~400 m IU/ml、そして後続のHDH試験で検査されねばならない拡大測定領域がhCG 400~1000 m IU/mlとなる。参考試料はhCG 300 m IU/mlで選択される。

第1回目の測定のための操作

[RIA 認識 HCG c.t. の構成成分 (Behring werke、マールブルグ) が用いられる]

実施例1におけると同様にして実施、試料量20 μl、トレーサー量200 μl、インキュベーション

| | | | | | |
|----|--------|-----|-----|-----|---------|
| 95 | 53278 | cpm | +++ | HDH | 200,000 |
| 96 | 35,009 | cpm | +++ | HDH | 300,000 |
| 97 | 31737 | cpm | +++ | HDH | 400,000 |
| 98 | 27,436 | cpm | +++ | HDH | 500,000 |
| 99 | 18,466 | cpm | +++ | HDH | 650,000 |

* AFP IU/mlは希釈により測定。

実施例 2

モノクローナル抗体に基づく2例性IRMAおよび2段階実施法による、患者血清中におけるヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG)の免疫学的測定

AFPと同様にhCGは2つの適応分野で重要である。

(1) ありうる流産を早期に識別するための妊娠経過の監視

(2) トロホプラスト腫瘍についての腫瘍マーカー

妊娠経過監視のための正常値はhCG 約100 ~

ヨシ時間1時間。

第4表:

標準曲線

総活性: 67,252 cpm

| | | | |
|-----|--------------------|-------|-----|
| 標準物 | 80 (hCG 0 m IU/ml) | 99 | cpm |
| | 81 (11 ") | 175 | cpm |
| | 82 (33 ") | 404 | cpm |
| | 83 (105 ") | 1186 | cpm |
| | 84 (300 ") | 3335 | cpm |
| | 85 (600 ") | 6767 | cpm |
| | 86 (1000 ") | 11305 | cpm |

患者試料:

| | | | | |
|----|-------|-----|-------|---------------|
| 58 | 1511 | cpm | 135 | (hCG m IU/ml) |
| 59 | 139 | cpm | 75 | " |
| 60 | 5700 | cpm | 510 | " |
| 61 | 192 | cpm | 127 | " |
| 62 | 41021 | cpm | >1000 | " |

| | | |
|----|------------|-------------------|
| 63 | 669 cpm | 58.2 (hCG mIU/ml) |
| 64 | 14,076 cpm | >1000 |
| 65 | 4,972 cpm | 617 |
| 66 | 5,110 cpm | 461 |
| 67 | 5,205 cpm | 469 |
| 68 | 4,467 cpm | 404 |

コア測定領域：試料 58、59、61および63

拡大測定領域：試料 60、65、66、67および68

測定領域外：試料 62および64

「HDE試験」のための操作

実施例1の記載と同様にして実施、試料量
100 μ l、トレーサー量 200 μ l、インキュベシ
ョン時間 10分。

参考試料 R (hCG 300 mIU/ml) 5,380 cpm

患者試料：

| | | |
|----|----------|---------|
| 60 | 9754 cpm | --- HDE |
| 65 | 851 cpm | +++ HDE |

ールプルダ) が用いられうる]

実施例1におけると同様にして実施、試料量
200 μ l、トレーサー量 100 μ l、インキュベシ
ョン時間 2時間。

第5表：

総活性：

| | | |
|-----|------------------------|------------|
| 標準物 | 80 (TSH 0 μ IU/ml) | 56 cpm |
| | 81 (0.13) | 209 cpm |
| | 82 (0.45) | 553 cpm |
| | 83 (1.45) | 1,550 cpm |
| | 84 (5) | 4,781 cpm |
| | 85 (5) | 10,976 cpm |
| | 86 (50) | 18,629 cpm |

患者血清：

| | | |
|-----|-----------|--------------------|
| 186 | 1885 cpm | TSH 19 μ IU/ml |
| 187 | 2518 cpm | 27 |
| 188 | 5,072 cpm | 60 |

| | | |
|----|---------|---------|
| 66 | 704 cpm | +++ HDE |
| 67 | 605 cpm | +++ HDE |
| 68 | 506 cpm | +++ HDE |

HDE - 陽性試料の含量は希釈することにより以
下のように測定された。

| | |
|----|--------------------|
| 65 | hCG 100,000 mIU/ml |
| 66 | 150,000 |
| 67 | 200,000 |
| 68 | 250,000 |

実施例 3

2種のモノクローナル抗体に基づく2側性 IRMA
および2段階実施法によるヒト甲状腺刺激ホル
モン (hTSH) の免疫学的測定

抗イディオタイプ抗体による抗原価増量の
原理による。

第1回目の測定のための操作

[RIA 認識 TSH c.b. の構成成分 (Behring werke, μ

| | | |
|-----|----------|------|
| 189 | 9363 cpm | 13.0 |
| 190 | 7230 cpm | 9.5 |

増強した試料 (TSH 添加)

| | | |
|---|-------|-----|
| 1 | 12236 | 224 |
| 2 | 18436 | 500 |
| 3 | 20325 | >50 |
| 4 | 20900 | >50 |
| 5 | 21111 | >50 |
| 6 | 20968 | >50 |
| 7 | 15394 | 367 |

コア測定領域：TSH 0~15 μ IU/ml

拡大測定領域：TSH 15~50 μ IU/ml

コア測定領域：試料 186~190

拡大測定領域：試料 1, 2および7

測定領域外：試料 3、4、5および6

抗イディオタイプ抗体は抗原と対照的に抗体
に対しただ1個の結合部位しか有しないので、

このものは標識されたかまたは未標識抗体と結合しうるがしかし何ら三成分複合物を形成できない。それゆえ抗原濃度が低い場合に抗イデオタイプ抗体を添加すると測定シグナルが減弱する、何故なら、抗原に就て三成分のシグナル生成性複合物を形成させるに充分な量の抗体をもはや入手利用できないからである。これに対し抗原濃度が高いと(第1図の領域C)、三成分複合物の形成が強く阻止されるので、抗イデオタイプ抗体の添加は実際上何ら付加的効果がない。

HDE 試験のための操作

反応体(試料 200 μ l および標識された抗体 100 μ l)に加え、米国特許第 4,536,477号の記載に従い調製された抗イデオタイプ抗体 1 μ g/ μ l を含有する溶液 20 μ l を加える。それ以外はすべての操作は第1図目の測定と同じである。

試料

| | |
|---|---------------|
| 1 | 2653 --- HDE |
| 2 | 14125 --- HDE |
| 7 | 15397 +++ HDE |

HDE 陽性の試料 7 は希釈することにより TSH 2000 μ IU/ μ l と測定された。

4. 図面の簡単な説明

第1図は抗原濃度の函数としての測定シグナルを示す。

第2図は抗原濃度の函数としての測定シグナルを種々の試料量について示す。

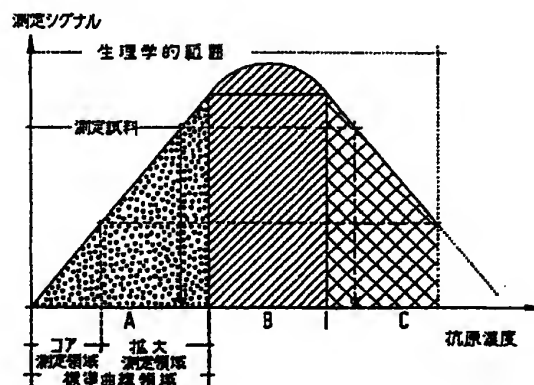
第3図は AFP ルーチン測定の代表的な頻度分布を示す。

特許出願人 ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト

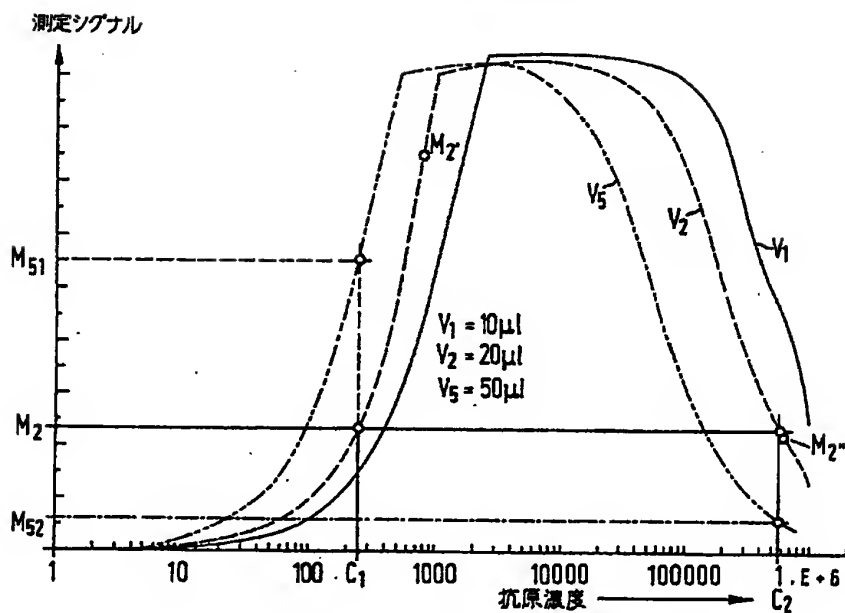
代理人 弁理士 高 木 千 嘉

外 2 名

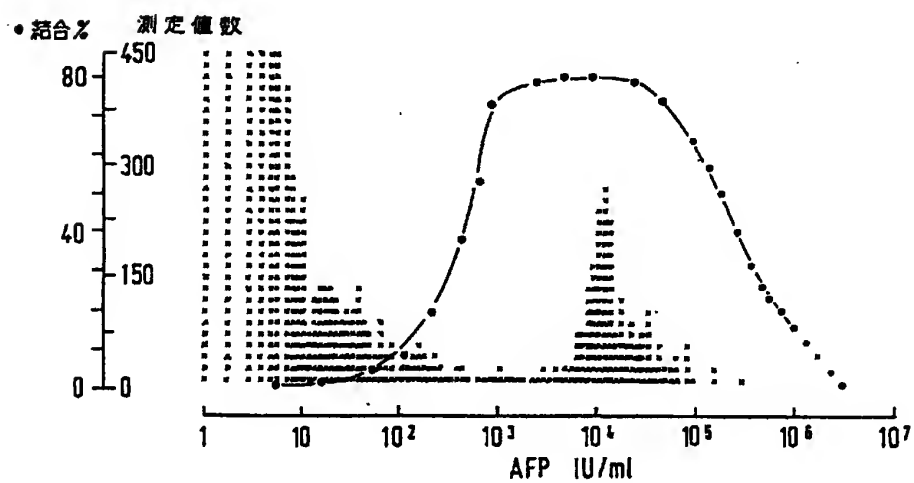
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 1 頁の続き

| | | |
|--------|--------------------------|--|
| ⑫発 明 者 | ギード・ジーモンズ | ドイツ連邦共和国デー - 6507 インゲルハイム・アム・ライ ン。タールシユトラーセ 24 |
| ⑬発 明 者 | ハインツ・ユルゲン・ スクルツイブツイーク | ドイツ連邦共和国デー - 6232 バードゾーデン・アム・タウ ヌス。アム・シエルベルク 16 |